Mikrosporidien: intrazelluläre Eukaryoten und opportunistische Krankheitserreger

Alexander MATHIS, Peter DEPLAZES & Rainer WEBER

Denisia **6**, zugleich Kataloge
des OÖ. Landesmuseums,
Neue Folge Nr. **184** (2002), 265-270

Abstract:

Microsporidia: intracellular eukaryotes and opportunistic pathogens

Microsporidia have a wide host range among invertebrate and vertebrate hosts. Their life cycle is characterised by an obligate intracellular development, the production of small spores, which are highly resistant in the environment, and the infection of new host cells by means of a so-called polar tube. Microsporidia emerged as important opportunistic parasites during the HIV-pandemic, and in addition to the known species *Encephalitozoon cuniculi* novel species have been diagnosed. *E. cuniculi* is a wide spread parasite of domestic rabbits in Middle Europe. The animals often act as symptomless carriers of the parasites, but occasionally they suffer from severe encephalitis. In AIDS patients, disseminated infections with neurological disorders and letal outcome have been reported. *E. hellem*, which has been discovered in HIV-infected patients, causes disseminated infections. This species eventually has been detected in birds, mainly parrots, which most probably represent the reservoir hosts. *Enterocytozoon bieneusi*, also first detected in humans, is the microsporidial species most often diagnosed in humans causing mainly diarrhea. *E. bieneusi* has also been found in a variety of mammals, but molecular-epidemiological studies revealed that the transmission of this parasite is not of zoonotic nature, a finding which has been confirmed by case control studies. Diagnosis of microsporidiosis of humans is achieved either by microscopy by detecting spores in stool and clinical specimens after specific staining or by molecular biological means.

Key words: Microsporidia, *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, zoonosis, opportunistic pathogens, AIDS, epidemiology.

1 Einleitung

Mikrosporidien sind Eukaryoten, die sich obligat intrazellulär entwickeln und sehr kleine, in der Umwelt resistente Sporen bilden. Sie zeichnen sich durch ihre einzigartige Weise aus, Zellen zu infizieren: der innerhalb der Spore spiralförmig aufgerollte, tubuläre Polfaden wird nach Stimulation explosionsartig ausgeschleudert, durchdringt die Wand einer neuen Wirtszelle und injiziert das Sporoplasma (den eigentlichen Parasiten) in das Zytoplasma der Wirtszelle.

Mikrosporidien wurden erstmals 1857 als Parasiten bei Insekten beobachtet; heute kennt man mehr als 1200 Arten in 143 Gattungen, welche als pathogene Erreger bei fast allen Wirbellosen sowie bei Wirbeltieren aller 5 Klassen beschrieben sind. Von ökonomischer Bedeutung sind Mikrosporidien als Krankheitserreger bei Insekten (Seidenraupen, Honigbienen) und Wirbeltieren. Von veterinärmedizinischer Bedeutung ist die Encephalitozoonose beim Kaninchen, eine weitverbreitete neurologische Krankheit, welche durch *Encephalitozoon cuniculi* verursacht wird. Eine relevante humanpathogene Bedeutung wurde den Mikrosporidien erst im Verlauf der HIV-Epidemie als opportunistische Krankheitserreger zuerkannt (WEBER et al. 2000). Nur 2 Jahre nach der Entdeckung von HIV als Ursache von AIDS im Jahre 1983 wurde die neue Mikrosporidien Gattung und Art *Enterocytozoon bieneusi* bei HIV-infizierten Patienten mit Durchfall entdeckt (DESPORTES et al. 1985; Tab. 1). Später wurden vier weitere, neue Mikrosporidien Arten aus drei Gattungen in HIV-infizierten Patienten entdeckt. Wegen der neuen medizinischen Bedeutung wurde die Forschung über Mikrosporidien auch in anderen Bereichen intensiviert und ergab überraschende Befunde. Molekular-genetische Studien

Tab. 1: Human-pathogene Mikrosporidien-Arten.

Art	Wirt*	Jahr	Anzahl von berichteten Infektionen im Menschen	Tierwirte
Enterocytozoon bieneusi	Mensch	1985	> 1000	Säugetiere
Encephalitozoon hellem	Mensch	1991	< 50	Vögel
Encephalitozoon intestinalis	Mensch	1993	< 200	Säugetiere
Vittaforma corneae	Mensch	1990/5	<5	?
Trachipleistophora hominis	Mensch	1996	<5	?
Encephalitozoon cuniculi	Kaninchen	1923	< 20	Säugetiere
Nosema algerae	Mücke	1970	<5	Insekten

*Erstbeschreibung

etwa zeigten, dass Mikrosporidien ein äußerst kleines Genom besitzen, welches für eine Art, *Encephalitozoon cuniculi* kürzlich vollständig sequenziert wurde (Katinka et al. 2001). Die Kompaktheit des Genoms wird durch eine Reduktion in Größe und Anzahl aller genetischer Elemente erreicht, teilweise durch Mechanismen, welche man nur bei Mikrosporidien kennt. Genauere Analysen korrigierten zudem das Bild der Mikrosporidien als ‚primitive', ursprüngliche Eukaryoten; die Mikrosporidien gelten heute als hoch entwickelte, parasitische Organismen, welche mit den Pilzen verwandt sind.

In Mitteleuropa wurden *E. hellem*, *E. cuniculi*, *E. intestinalis* und *Enterocytozoon bieneusi* in Menschen diagnostiziert. Die Anzahl klinischer Fälle in HIV-infizierten Patienten hat seit der Einführung der hoch wirksamen, antiretroviralen Kombinationstherapie sehr stark abgenommen. Nachfolgend werden allgemeine und spezielle Aspekte der drei medizinisch wichtigsten Mikrosporidien-Arten kurz dargestellt.

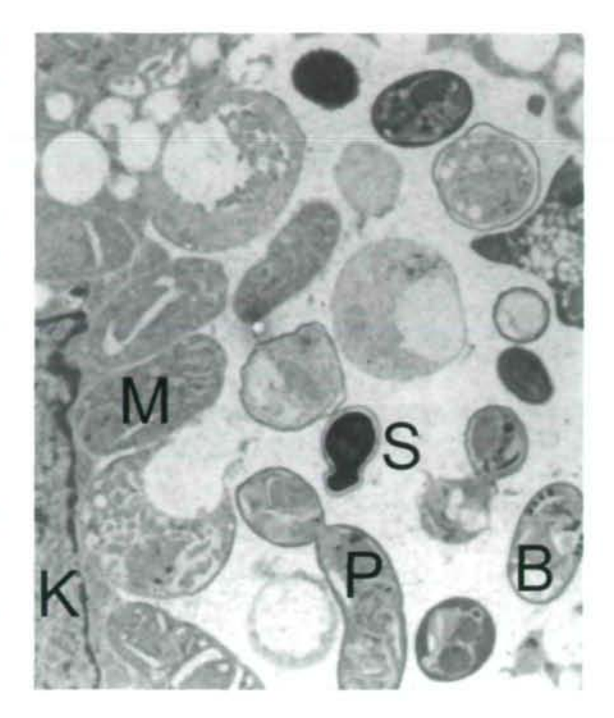


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Darstellung der Entwicklungsstadien von *Encephalitozoon cuniculi* in einer von der Wirtszelle gebildeten Vakuole in kultivierten, menschlichen Bindegewebszellen. K = Zellkern der Wirtszelle; M = Meront; P = Sporont, welcher sich in zwei Sproroblasten teilt; B = Sporoblast (2 µm lang), mit Querschnitten durch tubuläre Polfäden; S = reife Spore.

2 *Encephalitozoon cuniculi*

Die intrazelluläre Entwicklung von *E. cuniculi* ist in Abbildung 1 dargestellt. Auf die wiederholte, ungeschlechtliche proliferative Phase (Merogonie) folgt die Sporogonie (Sporonten, Sporoblasten, Sporen) und schließlich die infektiöse Phase, während der reife Sporen ausgeschieden werden, welche neue Wirtszellen infizieren.

E. cuniculi hat ein breites Wirtsspektrum von Wirbeltieren, und Infektionen bei Kaninchen, Nagern, Karnivoren und Affen sind von veterinärmedizinischer Bedeutung (Deplazes et al. 2000). *E. cuniculi* verursacht normalerweise asymptomatische Infektionen, welche über Jahre persistieren können. Bei Kaninchen können jedoch schwere neurologische Symptome aufgrund einer granulomatösen Encephalitis auftreten und zur typischen Kopfschiefhaltung der betroffenen Tiere führen (Abb. 2). Die Infektion in Kaninchen ist weit verbreitet: in einer seroepidemiologischen Untersuchung in der Schweiz waren 7,5 % von 292 gesunden Kaninchen positiv sowie 85 % von 72 Tieren mit neurologischen Symptomen (Deplazes et al. 2000). Molekularbiologische und immunologische Charakterisierung erlaubte, *E. cuniculi* in drei Stämme einzuteilen, welche gemäß der Hauptwirtstierart als *E. cuniculi* ‚Maus-Genotyp', ‚Kaninchen-Genotyp' und ‚Hund-Genotyp' bezeichnet wurden (Didier et al. 1995). *E. cuniculi* wurde seit 1959 in einigen wenigen Humanpatienten nachgewiesen, allerdings erfolgte die Identifizierung nur anhand der Sporenmorphologie. In AIDS-Patienten wurden disseminierte Infektionen, inklusive letalen Fällen mit neurologischen Symptomen (Weber et al. 1997), beschrieben, und sowohl der ‚Kaninchen-Genotyp' wie auch der ‚Hund-Genotyp' konnten identifiziert werden. Diese beiden Genotypen haben somit zoonotisches Potential. Interessanterweise wurde bisher noch nie



Abb. 2: Kopfschiefhaltung eines Hauskaninchens mit zerebraler Infektion durch *Encephalitozoon cuniculi*.

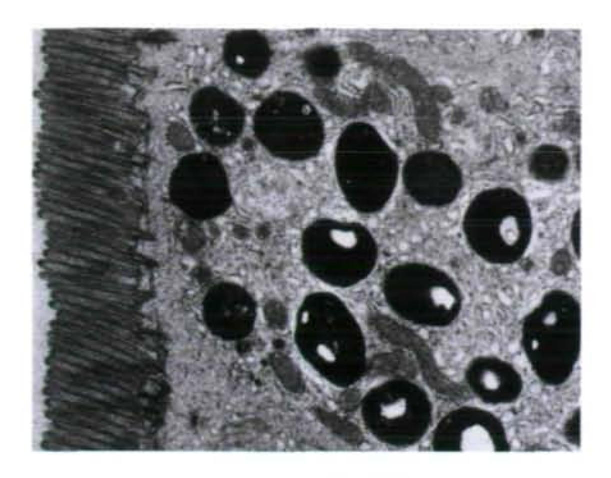


Abb. 3: Elektronenmikroskopisches Bild einer Dünndarmbiopsie mit Sporen von *Enterocytozoon bieneusi* (Durchmesser ca. 1,5 µm), die sich frei im Zytoplasma eines Enterozyten entwickelt haben (WEBER et al. 2000).

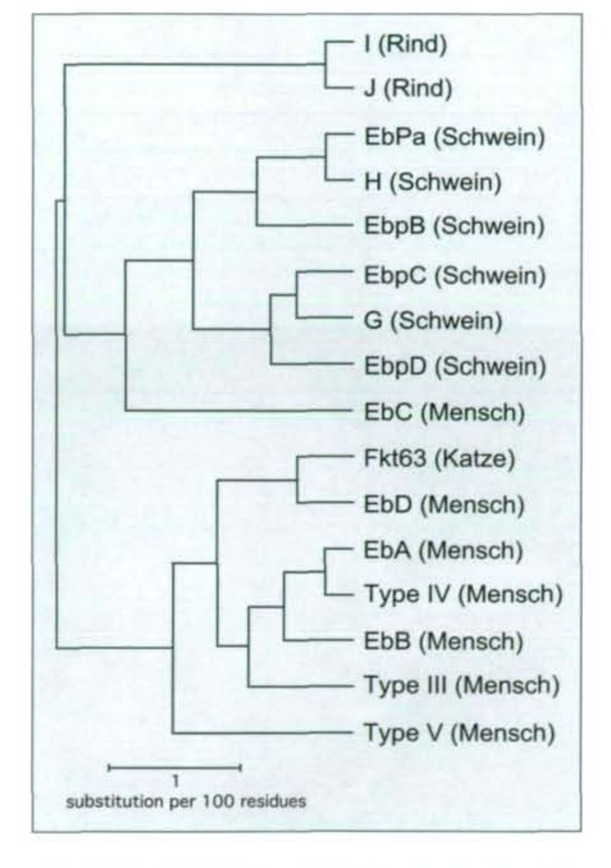


Abb. 4: Dendrogramm der rDNA ITS Sequenzen der *E. bieneusi*-Genotypen (Wirtsart in Klammern angegeben; Bezeichnung der Sequenzen gemäss GenBank).

eine Infektion eines Menschen mit *E. cuniculi* ‚Maus-Genotyp' gefunden, welcher auch aus Ratten in Zürich identifiziert wurde. Angesichts der räumlichen Nähe von Mensch und Nagern könnte dies auf eine unterschiedliche Virulenz der drei *E. cuniculi*-Stämme für den Menschen hindeuten.

3 *Encephalitozoon hellem*

E. hellem verursacht in HIV-infizierten Patienten disseminierte Infektionen mit Keratokonjunktivitis, Sinusitis, Bronchitis und Harnwegsinfektionen. In HIV-negativen, nicht immunsupprimierten Patienten ist nur ein Krankheitsfall mit *E. hellem* bekannt, nämlich bei einer Co-Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* (DEPLAZES et al. 2000).

Vor der erstmaligen Beschreibung von *E. hellem* im Jahre 1991 wurden Encephalitozoon-ähnliche Sporen bei verschiedenen Gelegenheiten hauptsächlich aus Papageien-Arten (Psittacidae) nachgewiesen, welche in Volieren gehalten wurden. Mit molekularen Analysen konnte *E. hellem* als aethiologische Ursache für ein Sterben von solcherart gehaltenen Wellensittich-Jungvögeln eruiert werde (BLACK et al. 1997). Ein erster Nachweis von *E. hellem* aus einem Wildfang gelang bei einem aus Indonesien in die Schweiz eingeführten und während der Quarantäne verstorbenen Schimmellori (*Chalcopsitta scintillata*) (SUTER et al. 1998). Mehrere Beobachtungen deuten darauf hin, dass *E. hellem* als latente Infektion in Vögeln persistiert und dass Stress, z.B. durch eine Ortsveränderung, den Grad der Resistenz gegenüber dieser Infektion vermindert.

Bisher wurden keine epidemiologischen Studien durchgeführt, welche Risiko-Faktoren für *E. hellem*-Infektionen des Menschen charakterisierten. Vögel sind mögliche Infektionsquellen für den Menschen, und interessanterweise besaßen tatsächlich einige Patienten mit okularer Mikrosporidiose exotische Vögel als Haustiere oder hatten nachweislich Kontakt zu solchen. Bisher gibt es aber keine Studien, welche die Prävalenz der Mikrosporidiose bei Ziervögeln oder das Vorkommen bei einheimischen Vögeln untersucht hätten.

4 *Enterocytozoon bieneusi*

E. bieneusi (Abb. 3) wurde 1985 erstmals in Dünndarmbiopsien von HIV-infizierten Patienten entdeckt (DESPORTES et al. 1985); sie ist die weitaus häufigste Mikrosporidien-Art beim Menschen und verursacht bei HIV-Infizierten hauptsächlich chronische Diarrhoe mit Prävalenzen von 2-50 % (WEBER et al. 2000). Bei immunkompetenten Personen wurden einzelne Fälle von Infektionen mit selbstlimitierender Diarrhoe beschrieben; eine vor kurzem erschienene Arbeit aus Spanien zeigt, dass 17 % von HIV-negativen, älteren Patienten, welche unter Diarrhoe litten, mit *E. bieneusi* infiziert waren (LORES et al. 2002).

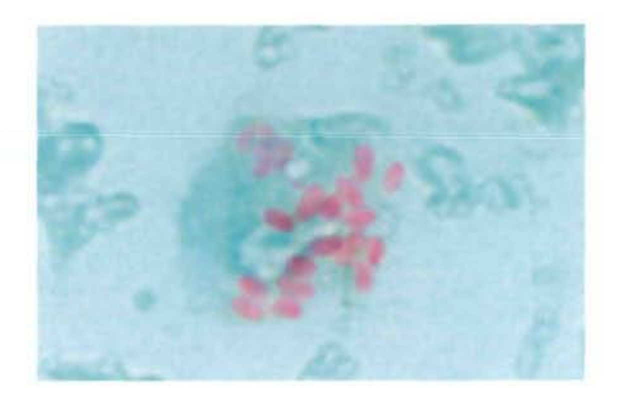


Abb. 5. Sporen (ca. 2 µm lang) von *Encephalitozoon hellem* im Urin-Sediment eines AIDS- Patienten (Chromotrop-Färbung).

Der erstmalige Nachweis von *E. bieneusi* beim Tier gelang uns 1996 bei Schweinen (DEPLAZES et al. 1996), und in nachfolgenden Untersuchungen wurde *E. bieneusi* auch in Kotproben von Katzen, Hunden und Rindern gefunden (Referenzen in MATHIS 2000). Genetische Variabilität am rDNA ‚internal transcribed spacer' (ITS) Lokus erlaubte, die Isolate aus Mensch in sieben Genotypen zu unterteilen. Die *E. bieneusi*-Isolate aus Tieren aus der selben geographischen Region (Europa) entsprachen anderen, neuen Genotypen (Abb. 4).

Von *E. bieneusi* bestehen also eine Vielzahl von Genotypen, welche gruppenweise eine gewisse Wirtsspezifität haben (Rinder, Schweine, Mensch). Auch wenn vereinzelte Ausnahmen von dieser Spezifität kürzlich berichtet wurden (so der Nachweis des *E. bieneusi*-Genotyps aus der Katze in einem AIDS-Patienten oder des human-pathogenen Genotyps EbD in 3 Schweinen), so scheint die Übertragung von *E. bieneusi* vorwiegend nicht von zoonotischer Natur zu sein. Für diese Hypothese, dass *E. bieneusi* natürlicherweise als fakultativ pathogener Erreger in der Darmflora des Menschen vorkommt und somit Infektion des Menschen nicht von Tier-Reservoiren abhängen, sprechen auch weitere Indizien: Eine Fallkontrollstudie zeigte, dass enger Kontakt unter HIV-infizierten Personen als Risikofaktor für eine intestinale Mikrosporidiose gilt, nicht aber Kontakte mit Tieren. Weiter konnten mit *E. bieneusi*-Isolaten aus Menschen keine entsprechenden klinischen Symptome in immunsupprimierten Tieren erzeugt werden. Interessant ist die Beobachtung, dass die Verteilung der *E. bieneusi*-Genotypen unterschiedlich ist in HIV-infizierten und nicht-infizierten Personen (LIGUORY et al. 2001). Dies ist in Übereinstimmung mit unseren Befunden der letzten Jahre, dass nämlich alle Infektionen bei nicht-HIV-Infizierten durch einen einzigen Genotypen (EbC) hervorgerufen wurden (SING et al. 2001 und unpublizierte Fälle). Dies deutet möglicherweise auf eine unterschiedliche Virulenz der verschiedenen *E. bieneusi*-Genotypen hin, die im Menschen gefunden wurden.

5 Diagnose und Therapie

Routinemäßig können Mikrosporidien-Sporen lichtmikroskopisch auf Schmier- oder Ausstrich-Präparaten von Stuhlproben, Urin-Sedimenten, respiratorischen Proben oder von Liquor nach Chromotrop-Färbung (Abb. 5) oder durch Chemofluoreszenz-Einsatz (z.B. Calcofluor, Uvitex) dargestellt werden (WEBER et al. 1999).

Diese Methoden erwiesen sich als genügend sensitiv für den Mikrosporidien-Nachweis bei klinischen Fällen. Eine Anreicherung der Sporen in klinischen Proben gelang bisher nicht.

In der Histologie können die Erreger noch mit weiteren Spezialfärbungen dargestellt werden. Die Elektronenmikroskopie ist weniger sensitiv als die Lichtmikroskopie, erlaubt jedoch die Darstellung verschiedener intrazellulärer Stadien.

Serologische Methoden des spezifischen Antikörpernachweises wurden besonders für die *Encephalitozoon*-Arten entwickelt, haben jedoch bisher keine Praxis-Anwendung erlangt. Neuerdings hat die PCR die viel aufwendigere, diagnostische in vitro-Kultivierung der Erreger verdrängt. Die sehr sensitiven molekularen Analysen ermöglichen zudem eine Erregertypisierung auf Genotyp-Ebene, was für molekularepidemiologische Untersuchungen Aussagekraft besitzt (Abb. 4).

Für die Chemotherapie der *Encephalitozoon*-Arten hat sich Albendazol als wirksam erwiesen. Nicht erhärtet werden konnte eine Wirksamkeit dieses Medikamentes in der Behandlung des durch *E. bieneusi* verursachten Durchfalls.

6 Zusammenfassung

Mikrosporidien haben ein breites Wirtsspektrum bei Wirbellosen und Wirbeltieren. Ihr Lebenszyklus ist charakterisiert durch eine obligat intrazelluläre Entwicklung, die Bildung von kleinen, in der Umwelt resistenten Sporen und die Infektion neuer Zellen mittels des sogenannten Polschlauches. Im Verlauf der HIV-Epidemie traten Mikrosporidien als wichtige opportunistische Krankheitserreger auf, und neben der bereits bekannten Art *Encephalitozoon cuniculi* wurden neue Arten beschrieben. *E. cuniculi* ist in Mitteleuropa ein weit verbreiteter Parasit bei Hauskanin-

chen, die oft symptomlose Parasitenträger sind, die jedoch auch an einer schwer verlaufenden Encephalitis erkranken können. In AIDS-Patienten wurden disseminierte Infektionen mit neurologischen Symptomen und letalem Verlauf beschrieben. *E. hellem*, der in HIV-infizierten Patienten entdeckt wurde, verursacht disseminierte Infektionen. Die Art konnte schließlich in Vögeln, vorwiegend Papageien-Arten, nachgewiesen werden, welche wahrscheinlich das Erreger-Reservoir darstellen. Auch *Enterocytozoon bieneusi* wurde in Menschen entdeckt; sie ist die am häufigsten diagnostizierte Mikrosporidien-Art beim Menschen und verursacht hauptsächlich Diarrhoe. *E. bieneusi* wurde auch in verschiedenen Tierarten gefunden, doch zeigten molekularepidemiologische Studien, dass die Übertragung von *E. bieneusi* nicht von zoonotischer Natur ist, was u.a. auch durch Fallkontrollstudien untermauert wird. Zur Diagnose der Mikrosporidiose des Menschen können Sporen lichtmikroskopisch aus Stuhl und klinischen Proben nach spezifischer Anfärbung dargestellt werden oder mittels molekularbiologischer Methoden nachgewiseen werden.

Schlüsselwörter: Mikrosporidien, *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, Zoonose, opportunistische Pathogene, AIDS, Epidemiologie.

7 Literatur

BLACK S.S., STEINOHRT L.A., BERTUCCI D.C., ROGERS L.B. & E.S. DIDIER (1997): *Encephalitozoon hellem* in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). — Vet. Pathol. **34**: 189-198.

DEPLAZES P., MATHIS A. & R. WEBER (2000): Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. — In: PETRY F. (Ed.): Cryptosporidiosis and Microsporidiosis. Basel, Karger: 236-260.

DEPLAZES P., MATHIS A., MULLER C. & R. WEBER (1996): Molecular epidemiology of *Encephalitozoon cuniculi* and first detection of *Enterocytozoon bieneusi* in faecal samples of pigs. — J. Eukaryot. Microbiol. **43**: 1-93.

DESPORTES I., LE CHARPENTIER Y., GALIAN A., BERNARD F., COCHAND-PRIOLLET B., LAVERGNE A., RAVISSE P. & R. MODIGLIANI (1985): Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bieneusi* n. g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. — J. Protozool. **32**: 250-254.

DIDIER E.S., VOSSBRINCK C.R., BAKER M.D., ROGERS L.B., BERTUCCI D.C. & J.A. SHADDUCK (1995): Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. — Parasitology **111**: 411-421.

KATINKA M.D., DUPRAT S., CORNILLOT E., METENIER G., THOMARAT F., PRENSIER G., BARBE V., PEYRETAILLADE E., BROTTIER P., WINCKER P., DELBAC F., EL ALAOUI H., PEYRET P., SAURIN W., GOUY M., WEISSENBACH J. & C.P. VIVARES (2001): Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. — Nature **414**: 450-453.

LIGUORY O., SARFATI C., DEROUIN F. & J.M. MOLINA (2001): Evidence of different *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in patients with and without human immunodeficiency virus infection. — J. Clin. Microbiol. **39**: 2672-2674.

LORES B., LOPEZ-MIRAGAYA I., ARIAS C., FENOY S., TORRES J. & C. DEL AGUILA (2002): Intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in elderly human immunodeficiency virus - negative patients from Vigo, Spain. — Clin. Infect. Dis. **34**: 918-921.

MATHIS A. (2000): Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. — Int. J. Parasitol. **30**: 795-804.

SING A., TYBUS K., HEESEMANN J. & A. MATHIS (2001): Molecular diagnosis of an *Enterocytozoon bieneusi* human genotype C infection in a moderately immunosuppressed human immunodeficiency virus seronegative liver-transplant recipient with severe chronic diarrhea. — J. Clin. Microbiol. **39**: 2371-2372.

SUTER C., MATHIS A., HOOP R. & P. DEPLAZES (1998): *Encephalitozoon hellem* infection in a yellow-streaked lory (*Chalcopsitta scintillata*) imported from Indonesia. — Vet. Rec. **143**: 694-695.

WEBER R., SCHWARTZ D. A. & P. DEPLAZES (1999): Laboratory diagnosis of microsporidiosis. — In: WITTNER A. (Ed.): Microsporidia and Microsporidiosis. ASM Press, Washington: 315-361.

WEBER R., DEPLAZES P. & D. SCHWARTZ (2000): Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. — In: PETRY F. (Ed.): Cryptosporidiosis and Microsporidiosis. Basel, Karger: 166-192.

WEBER R., DEPLAZES P., FLEPP M., MATHIS A., BAUMANN R., SAUER B., KUSTER H. & R. LUTHY (1997): Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with human immunodeficiency virus infection. — N. Eng. J. Med. **336**: 474-478.

Anschrift der Verfasser:

Dr. sci. nat. Alexander MATHIS
Prof. Dr. Peter DEPLAZES
Institut für Parasitologie
Universität Zürich
Winterthurerstr. 266a
CH-8057 Zürich
Schweiz
E-mail: parasito@vetparas. unizh.ch

Prof. Dr. Rainer WEBER
Abteilung Infektionskrankheiten und Spitalhygiene
Departement Innere Medizin
Universitätsspital
Rämistr. 100
CH-8091 Zürich
Schweiz
E-mail: infweb@usz.unizh.ch